

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2002-256075

(P2002-256075A)

(43) 公開日 平成14年9月11日 (2002.9.11)

(51) Int.Cl. ⁷	識別記号	F I	テ-マコ-ト* (参考)
C 0 8 G 81/00		C 0 8 G 81/00	4 C 0 8 1
A 6 1 L 15/16		C 0 8 B 31/04	4 C 0 9 0
	24/00		4 H 0 4 5
C 0 8 B 31/04		C 0 9 K 3/00	E 4 J 0 3 1
	37/04	C 0 7 K 7/08	Z N A
審査請求 未請求 請求項の数13 O L (全 13 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号 特願2001-54761(P2001-54761)

(22) 出願日 平成13年2月28日 (2001.2.28)

(71) 出願人 501450111

株式会社セントメド

愛知県名古屋市名東区一社二丁目185番地の2

(71) 出願人 396020800

科学技術振興事業団

埼玉県川口市本町4丁目1番8号

(72) 発明者 谷原 正夫

奈良県生駒市高山町8916-5 大学宿舍A-206

(74) 代理人 100090686

弁理士 飯田 充生

最終頁に続く

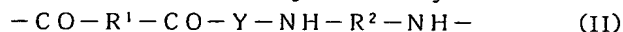
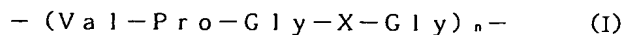
(54) 【発明の名称】 温度応答性材料およびそれを含む組成物

(57) 【要約】

【課題】 生体への適用により、温度に応答して塗布部にゲル状の皮膜を形成可能であるとともに、安全性の高い温度応答性材料を提供する。

【解決手段】 非動物性多糖類（澱粉などの植物性多糖類など）と、加熱により30℃以上の温度で凝集性を有するセグメントとを結合させることにより、温度に応答

して、溶液状からゲル状に変化する温度応答性材料を得る。この材料は、癒着防止材、組織接着材、創傷被覆材、止血材、塞栓材などの成分として有用である。凝集性セグメントは、N-イソプロピルアクリルアミド系重合体、N-ビニルイソ酪酸アミド系、下記式で表されるペプチド単位を有する。



(Xは、Val、Pro、Leu、Ile、Nleを表し、nは2以上の整数、Yは、式 (I) のペプチド鎖、上記X又はSarを示

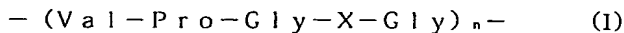
す。R¹及びR²はC₂₋₆ アルキレン基などを示す)

【特許請求の範囲】

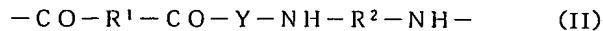
【請求項1】 非動物性多糖類の骨格と、加熱により凝集性を有するセグメントとが結合している温度応答性材料。

【請求項2】 非動物性多糖類の骨格に、30℃以上の温度で凝集性を有する側鎖が結合している請求項1記載の温度応答性材料。

【請求項3】 非動物性多糖類が、澱粉、セルロース、ペクチン、アルギン酸、カラゲナン、デキストラン、プルラン、およびキトサンから選択された少なくとも一種である請求項1記載の温度応答性材料。



(式中、Xは、Val、Pro、Leu、Ile、Nleから選ばれるアミノ酸残基を表し、nは1以上の整数



【式中、R¹、R²は、同一又は異なって、アルキレン基、シクロアルキレン基、アリーレン基を示し、Yは、 $-(\text{Val-Pro-Gly-X-Gly})_n-$ (X、nは前記に同じ)、Sar、Val、Pro、Leu、Ile、Nleより選ばれるアミノ酸残基を表す]で表されるペプチド共重合体単位から選択された少なくとも一種のユニットで構成されている請求項1～5のいずれかの項に記載の温度応答性材料。

【請求項7】 式(II)において、R¹、R²がC₂₋₆アルキレン基である請求項6記載の温度応答性材料。

【請求項8】 凝集性を有するセグメントが、(1)少なくともN-イソプロピルアクリルアミドで構成された単量体の重合体；(2)少なくともN-ビニルイソ酪酸アミドで構成された単量体の重合体；(3)H-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-NH₂ (式中、Xは、Val、Pro、Leu、Ile、Nleから選ばれるアミノ酸残基を表し、nは2以上の整数を表す。)；(4)(N'^α、N'^ε、N''^α、N''^ε-テトラ(H-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-N^α、N^ε-ジリジル)リジルーβ-アラニン(式中、Xおよびnは前記に同じ)；(5)(N'^α、N'^ε、N''^α、N''^ε-テトラ(H-His-Val-Gln-Val-His-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-N^α、N^ε-ジリジル)リジルーβ-アラニン(式中、Xおよびnは前記に同じ)；(6)-CO-R¹-CO-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-NH-R²-NH- (式中、X、n、R¹およびR²は前記に同じ)；(7)-CO-R¹-CO-Sar-NH-R²-NH- (式中、R¹およびR²は前記に同じ)；(8)-CO-R¹-CO-X-NH-R²-NH- (式中、X、R¹およびR²は前記に同じ)から選択された少なくとも一種のユニットである請求項1～7のいずれかの項に記載の温度応答性材料。

【請求項9】 凝集性を有するセグメントの割合が、全体の3～90重量%である請求項1～8のいずれかの項

【請求項4】 非動物性多糖類が、植物性多糖類である請求項1記載の温度応答性材料。

【請求項5】 凝集性を有するセグメントが、(1)ポリアクリルアミド誘導体、(2)ポリ-N-ビニルアシルアミド、(3)Val、Leu、Ile、Nle、Pro、His、Phe、Trpから選択された少なくとも一種のアミノ酸残基を有するペプチド単位から選択された少なくとも一種のユニットで構成されている請求項1～4のいずれかの項に記載の温度応答性材料。

【請求項6】 凝集性を有するセグメントが、下記式(I)

を表す]で表されるペプチド単位、および下記式(II)

に記載の温度応答性材料。

【請求項10】 凝集性を有するセグメントが、His残基を1～5個の範囲で含むpH応答性セグメントを含み、かつ中性付近で加水分解促進活性を示す請求項1～9のいずれかに記載の温度応答性材料。

【請求項11】 30℃以上の温度で、溶液状からゲル状に変化する温度応答性を有する請求項1～10のいずれかに記載の温度応答性材料。

【請求項12】 請求項1～11のいずれかの項に記載の温度応答性材料を含む温度応答性組成物。

【請求項13】 癒着防止材、組織接着材、創傷被覆材、止血材および塞栓材から選択された少なくとも一種である請求項12記載の温度応答性組成物。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は新規な温度応答性材料(特に温度応答性生体材料)及びそれを含む温度応答性組成物に関する。さらに詳しくは、本発明は、生体に適用後、温度にตอบสนองして溶液状からゲル状に変化して、塗布部にゲル状皮膜を形成可能な温度応答性生体材料に関する。本発明の材料は、癒着防止材、組織接着材、創傷被覆材、止血材、塞栓材などの構成成分として有用である。

【0002】

【従来の技術】術後の癒着防止、組織接着や縫合などには、ポリ乳酸、酸化セルロースなどの生分解性高分子が使用されている。しかし、これらの生分解性高分子は術部又は患部への保持性が低いとため、確実かつ効率よく癒着を防止することができない。

【0003】特定の成分の分離、吸着や放出性を示す温度応答性を示す高分子として、ポリ-N-アルキルアクリルアミド誘導体が知られている。特開2000-344835号公報には、溶液中で温度応答性を示す高分子として、少なくともヒドロキシアルキルアクリルアミドを単量体とする重合体が提案されている。この文献に

は、温度変化などの物理的刺激により極性変化と共に伸縮・凝集性を示すことを利用して、上記重合体を、物質の分離、吸着、放出機能材料として利用することも記載されている。

【0004】特開平9-169850号公報には、ポリイソプロピルアクリルアミドなどのポリアクリルアミド誘導体のブロックAと、ポリビニル誘導体のブロックBとのAB型ブロック共重合体で構成され、低温側ではミセル形成、高温側では沈殿生成を可逆的に生じさせる温度応答性高分子又は温度応答性ミセルが提案されている。特開平8-143631号公報には、N-ビニルイソ酪酸アミドなどのN-ビニルC₃₋₉アシルアミドと、N-ビニルアセトアミドなどのN-ビニルC₁₋₃アシルアミドとの共重合体で構成された温度応答性高分子材料が提案されている。

【0005】Prog. Biophys. molec. Biol., Vol. 57, pp. 23-57 (1992) には、-Val-Pro-Gly-X-Gly- (Xは、Ty r、Phe、Glu、Lys、Gly、Val、Leuより選ばれるアミノ酸残基を表す) の繰返し配列を有する温度応答性ポリペプチドが報告されている。さらに、米国特許第5, 519, 004号明細書には、-R1-Pro-Gly-R2-Gly- (R1は、Ala、Glyから選られ、R2は、Gly、Alaから選られるか、又は直接結合を示す) のペンタ/テトラペプチドの繰返し配列からなり、生物材料の接着を阻害する弾性ポリペプチドが提案されている。

【0006】しかし、これらの温度応答性高分子又はペプチドは、温度にตอบสนองして溶液とゲルとを可逆的に形成できない。すなわち、上記高分子やペプチドは溶液から沈殿物へと変化し、皮膜を形成しない。また、化学的又は物理的に架橋した高分子やペプチドはゲル状皮膜を形成するものの、もはや溶液とはならない。

【0007】特開2000-80158号公報には、分子量が100~10000のポリオキシアルキレン単位を繰返し単位として含む脂肪族ポリエーテルエステルで構成された温度応答性ハイドロゲルが開示されている。しかし、このハイドロゲルを生体に適用すると、ポリオキシアルキレン鎖に由来する毒性が懸念される。

【0008】大屋章二らは、「人工臓器」29(2)、446-451(2000)において、生体由来ムコ多糖類であるヒアルロン酸に、イニファタ(重合開始-連鎖移動-重合停止剤として機能する分子)であるベンジルジチオカルバメート基を導入し、リビングラジカル重合法を利用してN-イソプロピルアクリルアミドをグラフト重合することにより、加温により析出可能な感温性ヒアルロン酸が得られることを報告している。この文献には、前記感温性ヒアルロン酸が、細胞非接着マトリックスとして機能し、加温により白濁し、光線透過率が低下することも報告されている。しかし、この感温性ヒア

ルロン酸を生体に適用すると、動物性のヒアルロン酸に由来する感染の危険性がある。

【0009】Macromol Chem. Phys., 201, 613-619 (2000) には、N-イソプロピルアクリルアミドとN, N-ジメチルアクリルアミドとの共重合体をデキストランにグラフトした温度応答性高分子が報告されている。しかし、この高分子はゲル状物を形成できない。

【0010】さらに、温度にตอบสนองして凝集性を示す前記重合体を、切開部などの患部や組織間に適用しても、高い安全性で、組織の癒着を有効に防止したり、組織を保護することが困難である。

【0011】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明の目的は、新規な温度応答性材料(温度応答性高分子、又は温度応答性重合体)を提供することにある。

【0012】本発明の他の目的は、生体への適用により、温度にตอบสนองして溶液状からゲル状に可逆的に変化し、塗布部にゲル状の皮膜を形成可能であるとともに、安全性の高い温度応答性材料(又は生体適合性重合体)を提供することにある。

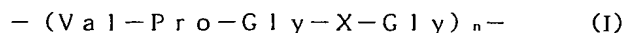
【0013】本発明のさらに他の目的は、患部に適用するのに有用な温度応答性組成物を提供することにある。

【0014】本発明の別の目的は、癒着防止材、組織接着材、(創傷)被覆材、止血材、塞栓材などとして有用な温度応答性組成物を提供することにある。

【0015】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、前記目的を達成するため鋭意検討の結果、非動物性多糖類と、加温により凝集又は析出可能なセグメントとを組み合わせると、生体適合性及び安全性に優れるとともに、温度に応じて溶液の形態とゲルの形態とを可逆的に形成することを見だし、本発明を完成した。

【0016】すなわち、本発明の温度応答性材料(又は温度応答性重合体)は、非動物性多糖類の骨格と、加熱により凝集性を有するセグメント(30℃以上の温度で凝集性を有する側鎖など)とが結合している。前記非動物性多糖類には、例えば、澱粉、セルロース、ペクチン、アルギン酸、カラゲナン、デキストラン、プルラン、キトサンなどが例示できる。非動物性多糖類は、通常、植物性多糖類である。凝集性を有するセグメントは、種々のセグメント、例えば、(1)ポリアクリルアミド誘導体、(2)ポリ-N-ビニルアシルアミド、(3)Val、Leu、Ile、Nle、Pro、His、Phe、Trpから選択された少なくとも一種のアミノ酸残基を有するペプチド単位などを包含する。前記凝集性セグメントのペプチド単位(3)は、例えば、下記式(I)で表されるペプチド単位



(式中、Xは、Val、pro、Leu、Ile、Nleから選ばれるアミノ酸残基を表し、nは1以上の整数

を表す) 下記式 (II) で表されるペプチド共重合体単位



【式中、 R^1 、 R^2 は、同一又は異なって、アルキレン基、シクロアルキレン基、アリーレン基を示し、 Y は—(Val—Pro—Gly—X—Gly) $_n$ —(X 、 n は前記に同じ)、Sar、Val、Pro、Leu、Ile、Nleより選ばれるアミノ酸残基を表す]などのユニットで構成できる。凝集性を有するセグメントの割合は、全体の3～90重量%程度であってもよく、His残基を1～5個の範囲で含むpH応答性セグメントを含み、かつ中性付近で加水分解促進活性を示すセグメントであってもよい。前記材料は、30℃以上の温度で、溶液状からゲル状に変化する温度応答性を有しており、温度にตอบสนองして溶液—ゲル状態を可逆的に形成してもよい。

【0017】本発明には、前記温度応答性材料を含む温度応答性組成物も含まれる。この組成物は、癒着防止材、組織接着材、被覆材(創傷被覆材など)、止血材、塞栓材などとして利用できる。

【0018】

【発明の実施の形態】本明細書において、各種アミノ酸残基は次の略号で記述する。

【0019】

Ala: L-アラニン残基

Arg: L-アルギニン残基

Asn: L-アスパラギン残基

Asp: L-アスパラギン酸残基

Cys: L-システイン残基

Gln: L-グルタミン残基

Glu: L-グルタミン酸残基

Gly: グリシン残基

His: L-ヒスチジン残基

Ile: L-イソロイシン残基

Leu: L-ロイシン残基

Lys: L-リジン残基

Met: L-メチオニン残基

Nle: L-ノルロイシン残基

Phe: L-フェニルアラニン残基

Pro: L-プロリン残基

Sar: サルコシン残基

Ser: L-セリン残基

Thr: L-トレオニン残基

Trp: L-トリプトファン残基

Tyr: L-チロシン残基

Val: L-バリン残基

また、本明細書では、常法に従って、ペプチドのアミノ酸配列を、そのN末端のアミノ酸残基が左側に位置し、C末端のアミノ酸残基が右側に位置して記述する。

【0020】【温度応答性材料又生体適合性重合体】本発明の温度応答性材料は、非動物性多糖類の骨格と、こ

の多糖類に結合した凝集性セグメントとで構成されており、凝集性セグメントは、加熱又は加温により凝集又は析出する性質を有している。

【0021】非動物性多糖類は、植物や藻類、菌類などの非動物由来の多糖類であり、多糖類からの誘導体、化学的に合成された多糖類であってもよい。動物由来の多糖類は、ウイルスや細菌、プリオンなどの既知の病原体に加えて、未知の病原体による種を超えた感染が懸念されている。また、種間の距離が近いほど、種を超えた感染の危険性が增大することが指摘されている。従って、ヒトに適用する材料は、できるだけヒトとの距離が離れた種由来の多糖類が好ましい。すなわち、本発明における多糖類は、非動物性であり、植物(海藻類を含む)由来の多糖類、微生物由来の多糖類、非哺乳類由来の動物多糖類(特に植物由来の多糖類)であるのが好ましい。

【0022】多糖類は、ホモグリカン(グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、ガラクトツロン酸、グルコサミンなどを単糖とする多糖類)、ヘテログリカン(グルコース、フルクトース、マンノース、ガラクトース、アラビノース、キシロース、グルクロン酸などを構成糖とする多糖類)のいずれであってもよい。

【0023】多糖類としては、植物由来の多糖類(セルロース、ヘミセルロース、デキストラン、イヌリン、レバン、キシラン、マンナン、ガラクトタン、ペクチン、デンプン、ガラクトマンナン(又はグアーガム)、グルコマンナン(又はコンニャクマンナン)、ローカストビーンガム、タマリンドガム、アラビアガム、ゲランガム、トラガカントガム、カラヤガム、アラビノガラクトタン、寒天、カラギーナン(又はカラゲナン)、アルギン酸など)、微生物由来の多糖類(キサンタンガム、プルラン、エルウィナガム、スクレログルカン、ガラクトグルカンなど)、非哺乳類の動物由来の多糖類(キチンなど)、それらの誘導体(デキストリン、シクロデキストリン、メチルセルロース、エチルセルロース、ヒドロキシエチルセルロース、ヒドロキシプロピルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロース、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレート、カルボキシメチルセルロースなどのセルロースエーテル、セルロースアセテートフタレートなどのセルロースエステル、セルロースエーテルエステル、メトキシ化ペクチン、カルボキシメチル化デンプン、キトサンなど)などが例示できる。これらの多糖類は単独で又は二種以上組み合わせ使用できる。

【0024】植物由来の多糖類又はその誘導体のうち、澱粉、セルロース、ペクチン、アルギン酸、カラゲナン、デキストランなどが繁用され、微生物由来の多糖類又はその誘導体のうちプルランなどが繁用され、非哺乳類の動物由来多糖類としてキトサンなどが繁用される。

特に、植物由来の植物性多糖類（澱粉、セルロース、アルギン酸など）が好ましい。

【0025】多糖類の分子量は特に制限されず、例えば、数平均分子量500～100×10⁴、好ましくは1000～70×10⁴（特に1×10⁴～50×10⁴）程度の範囲から適当に選択できる。

【0026】凝集性を有するセグメント（又はフラグメント、側鎖）の種類は、水溶液の形態で、加熱により凝集性を有する限り特に制限されず、例えば、温度30℃以上（好ましくは30～50℃、さらに好ましくは33～45℃、特に35～44℃程度）で凝集性又は析出性を有するセグメントなどが例示できる。このようなセグメントでは、通常、水素結合に関与し、かつ低温で安定な結合を形成する官能基と、疎水結合に関与し、かつ高温側で安定な結合を形成する官能基とがバランスよく配置されており、前記官能基の割合により凝集温度を制御可能である(Prog. Biophys. molec. Biol., Vol.57, p.23-57(1992))。すなわち、水素結合に関与する官能基数が多くなると凝集温度が高くなり、疎水結合に関与する官能基数が多くなると凝集温度が低くなる。水素結合の数と疎水性基に含まれる炭素原子の数との割合（以下、単に水素結合／炭素原子の割合という場合がある）は、所望する凝集温度に応じて適当に選択でき、通常、前者／後者＝2／8～5／5、好ましくは2.5／7.5～4.5／5.5程度である。

【0027】なお、水素結合を形成する基としては、ヒドロキシル基、カルボキシル基、アミノ基、アミド基、メルカプト基などが例示でき、疎水性基としては、メチル、エチル、プロピル、イソプロピル、ブチル、イソブチル、*t*-ブチル、イソペンチル、ネオペンチル基などのアルキル基（C₁₋₆アルキル基など）、シクロヘキシル基などのシクロアルキル基（C₆₋₁₂シクロアルキル基など）、フェニル基などのアリール基（C₆₋₁₂アリール基など）、ベンジル基などのアラールキル基（フェニル-C₁₋₄アルキル基など）、窒素、酸素及び硫黄原子から選ばれた少なくとも1つのヘテロ原子を含む5又は6員複素環基（ピロリジニル基、イミダゾリル基など）、縮合複素環基（インドリル基など）などが例示できる。

【0028】凝集性を有するセグメント（又は側鎖）としては、例えば、（a）疎水性基と水素結合性基とを有する高分子セグメント（以下、単に凝集性高分子という）、（b）疎水性基と水素結合性基とを有するペプチドセグメントなどが例示でき、この凝集性ペプチドセグメント（b）は、（b1）疎水性アミノ酸残基と水素結合性アミノ酸残基とを有するペプチドセグメント（以下、単に凝集性ペプチドという）、（b2）アミノ酸又はペプチド残基を有するペプチド共重合体セグメント（以下、単に凝集性ペプチド共重合体という）などであってもよい。さらに、（a）凝集性高分子、（b1）凝集性ペプチド、（b2）凝集性ペプチド共重合体は、直鎖状であって

もよくアミノ基などの活性点から鎖が分岐して伸長した分岐鎖状であってもよい。これらの凝集性セグメントは単独で又は二種以上組み合わせて前記多糖類の骨格に導入できる。

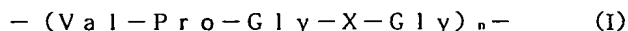
【0029】（a）前記凝集性高分子としては、例えば、アクリルアミド又はその誘導体〔アクリルアミド、N-C₁₋₆アルキルアクリルアミド（N-メチルアクリルアミド、N-エチルアクリルアミド、N-プロピルアクリルアミド、N-イソプロピルアクリルアミド、N-ブチルアクリルアミド、N-イソブチルアクリルアミド、N-*t*-ブチルアクリルアミド、N-ヘキシルアクリルアミドなど）など〕、N-ビニルアシルアミド（N-ビニルホルミルアミド、N-ビニルアセトアミド、N-ビニルイソ酪酸アミド、N-ビニルバレリル酸アミド、N-ビニルイソバレリル酸アミドなどのN-ビニルC₁₋₁₀アシルアミド）から選択された単量体の重合体が例示できる。これらの単量体は単独で又は組み合わせて使用でき、重合体は単独重合体又は共重合体であってもよい。好ましい単量体は、通常、イソプロピル基などの分岐鎖状C₃₋₅アルキル基を有している。さらに、必要であれば、他の単量体（スチレンなどの芳香族ビニル単量体、（メタ）アクリル系単量体、ビニルエステル系単量体、ビニルアルキルエーテル系単量体など）との共重合体であってもよい。

【0030】より具体的には、前記凝集性高分子（a）としては、例えば、（a1）少なくともN-C₁₋₆アルキルアクリルアミドを単量体成分とする単独又は共重合体、特に少なくともN-イソプロピルアクリルアミドで構成された単量体の重合体（N-イソプロピルアクリルアミド系重合体）、例えば、ポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（水素結合／炭素原子の割合＝2.9／7.1）、N-イソプロピルアクリルアミド-アクリルアミド共重合体など；（a2）少なくともN-ビニルC₁₋₁₀アシルアミドを単量体成分とする単独又は共重合体、特に少なくともN-ビニルイソ酪酸アミドで構成された単量体の重合体（N-ビニルイソ酪酸アミド系重合体）、例えば、ポリ-N-ビニルアセトアミドの他、ポリ-N-ビニルイソ酪酸アミド（水素結合／炭素原子の数の比が＝2.9／7.1）、N-ビニルアセトアミド-N-ビニルイソ酪酸アミド共重合体などが例示できる。

【0031】（b）凝集性ペプチドセグメントは、アミノ酸残基として、アルキル基（例えば、メチル、イソプロピル、イソブチル、*s*-ブチル、*n*-ブチル基、イソペンチル基、ネオペンチル基などのC₁₋₆アルキル基）、同素又は複素環基（例えば、シクロヘキシル基などのC₆₋₁₂シクロアルキル基、フェニル基などのアリール基、ベンジル基などのフェニル-C₁₋₄アルキル基、ピロリジニル基、イミダゾリル基などの1又は複数のヘテロ原子（窒素、酸素及び硫黄原子）を含む5又は6員

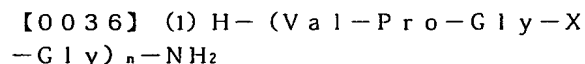
複素環基、インドリル基などの縮合複素環基)を有していてもよい。特に、凝集性ペプチドセグメントは、通常、バルキー又は嵩高い基、例えば、イソプロピル、イソブチル、s-ブチル、n-ブチル基などの直鎖又は分岐鎖状C₃₋₅アルキル基(特に分岐鎖状C_{3,4}アルキル基)、フェニル基、ベンジル基、5又は6員複素環基、縮合複素環基を有している。

【0032】すなわち、好ましい凝集性ペプチドセグメントは、Val、Leu、Ile、Nle、Pro、His、Phe、Trpなどのアミノ酸残基(特に、Val、Leu、Ile、Nle、Pro、His)を有している。ペプチドセグメントは、これらアミノ酸残基のうち単一のアミノ酸残基を含んでいてもよいが、通常、複数のアミノ酸残基(例えば、Val、Leu、Ile



(式中、Xは、Val、Pro、Leu、Ile、Nleから選ばれるアミノ酸残基を表し、nは1以上の整数を表す)で表されるペプチド単位又はペプチドユニットを有している。なお、係数nは、例えば、1~100(例えば、2~100)、好ましくは1~50(例えば、2~50)、さらに好ましくは2~30程度であり、通常、2~25(例えば、2~10)程度であってもよい。

【0035】このようなペプチド単位を有する凝集性ペプチドとしては、例えば、下記式で表されるペプチドが例示できる。



(Xおよびnは前記に同じ。水素結合/炭素原子の割合=3.8/6.2)



【式中、R¹、R²は、同一又は異なって、アルキレン基、シクロアルキレン基、アリーレン基を示し、Yは-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n- (X、nは前記に同じ)、Sar、Val、Pro、Leu、Ile、Nleより選ばれるアミノ酸残基を表す]で表されるペプチド共重合体単位又はユニットを有している。

【0038】アルキレン基としては、メチレン、エチレン、トリメチレン、プロピレン、テトラメチレン、ペンタメチレン、3、3-ジメチルトリメチレン、ヘキサメチレン基などの直鎖状又は分岐鎖状C₁₋₈アルキレン基などが例示できる。シクロアルキレン基としては、シクロヘキシレン基などのC₄₋₈シクロアルキレン基などが例示でき、アリーレン基としては、フェニレン基、ナフチレン基などが例示できる。好ましい基R¹、R²は、生体内で分解可能な共重合体を形成するアルキレン基、例えば、C₂₋₆アルキレン基、特にC_{2,4}アルキレン基である。

【0039】このようなペプチド共重合体は、例えば、下記式で表される共重合ユニットを有している。

e、Nle、Pro、His、Phe、Trpから選択された複数のアミノ酸残基を含んでいる。複数のアミノ酸残基の組合せとしては、例えば、ValとProとの組合せ、Val及び/又はProとLeu、Ile、Nleから選択された少なくとも一種との組合せ、ValとHisとの組合せ、ProとHisとの組合せ、HisとLeu、Ile、Nleから選択された少なくとも一種との組合せなどが例示できる。

【0033】凝集性セグメントを構成するペプチドは、ラセミ体であってもよく、アミノ酸残基が立体配置して、R体やS体を形成し、光学活性を有していてもよい。

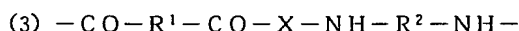
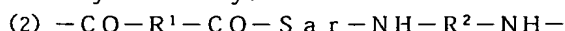
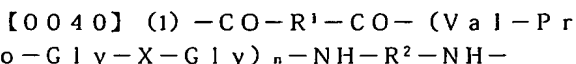
【0034】(b1)凝集性ペプチドは、通常、下記式(I)

(2) (N'α, N'ε, N''α, N''ε-テトラ(H-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-Nα, Nε-ジリジル)リジルーβ-アラニン(式中、Xおよびnは前記に同じ)

(3) (N'α, N'ε, N''α, N''ε-テトラ(H-His-Val-Gln-Val-His-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-Nα, Nε-ジリジル)リジルーβ-アラニン(式中、Xおよびnは前記に同じ)(Xおよびnは前記に同じ。水素結合/炭素原子の割合=3.8/6.2~4.3/5.7)

(b2)凝集性ペプチド共重合体は、前記凝集性ペプチドセグメントと同様のアルキル基や、同素又は複素環基を有していてもよく、N-アルキルアミノ基(N-C₁₋₄アルキルアミノ基など)を有していてもよい。

【0037】ペプチド共重合体は、通常、下記式(II)



(式中、X、n、R¹およびR²は前記に同じ)

これらの凝集性ペプチド共重合体は単独で又は二種以上組み合わせて利用できる。なお、凝集性ペプチド共重合体を複数の共重合ユニット(例えば、前記共重合ユニット(1)~(3))で構成する場合、各共重合ユニットに対応する成分を、それぞれ5~90モル%、好ましくは10~80モル%、さらに好ましくは25~75モル%程度の範囲から選択して総量を100モル%とし、共重合することにより調製してもよい。このような共重合において、通常、前記共重合ユニット(1)及び/又は(3)の割合は、凝集性ペプチド共重合体全体の5~100モル%、好ましくは10~100モル%、さらに好ましくは25~100モル%程度(例えば、30~95モル%)程度となるように調整するのが好ましい。

【0041】なお、必要であれば、多糖類には他のセグ

メント（例えば、非凝集性高分子、非凝集性ペプチド、非凝集性ペプチド共重合体などの非凝集性セグメント）が結合していてもよい。前記凝集性セグメントは、多糖類に結合するセグメント全体の10～100モル%、好ましくは20～100モル%、さらに好ましくは30～100モル%程度の範囲から選択できる。

【0042】凝集性セグメントの分子量は、プルラン換算で、重量平均分子量3000～ 2.0×10^4 程度であり、通常、5000～ 1.0×10^4 、好ましくは 1×10^4 ～ 8×10^4 、さらに好ましくは 2×10^4 ～ 6×10^4 （例えば、 2×10^4 ～ 4×10^4 ）程度である。

【0043】凝集性セグメントの割合は、水溶液の形態で加熱により凝集性が発現する限り特に制限されず、例えば、重合体全体に対して、3～90重量%、好ましくは5～90重量%、さらに好ましくは10～85重量%程度であり、15～80重量%（例えば、20～80重量%）程度であってもよい。

【0044】前記凝集性セグメントにおいて、His残基を含む凝集性ペプチドセグメント（特にペプチドユニット又はペプチド共重合体ユニット中に1～5、好ましくは1～3、さらに好ましくは2～3程度の範囲でHis残基を含むペプチドセグメント）は、pH応答性を示す。すなわち、pHの変化に応じてHis残基の側鎖イミダゾリル基の解離状態が変化するpH応答性を有しており、特に、pH6以下の酸性ではイミダゾリル基がプロトン化されて正電荷を有するが、pH6～7の範囲では脱プロトン化され、pH7以上では中性型となる。さらに、His残基を含む凝集性ペプチドセグメントは、中性付近（例えば、pH6～8程度）で加水分解促進性を示す。すなわち、pH6以下の酸性で存在するプロトン化されたイミダゾリル基は、糖鎖のグリコシド結合を加水分解する活性を示さないが、中性付近で存在するイミダゾリル基は、窒素原子上の対電子対によるグリコシド結合を加水分解する活性を有する。そのため、His残基を含む凝集性セグメントを利用すると、pHに応答して分解性を促進することができ、生体に適用する材料として適している。

【0045】前記凝集性高分子（ポリ-N-イソプロピルアクリルアミドやポリ-N-ビニルイソ酪酸アミドなど）は、慣用の重合法、例えば、対応する単量体（N-イソプロピルアクリルアミド、N-ビニルイソ酪酸アミドなど）を、ラジカル重合開始剤（アゾビスイソブチロニトリルなどのアゾ化合物や過酸化ベンゾイルなどの過酸化化合物など）を用いて重合することにより得ることができる。さらに、前記凝集性高分子は、慣用の方法により、多糖類に導入できる。例えば、前記重合において、反応性基を有する連鎖移動剤（メルカプトエチルアミン、3-メルカプトプロピオン酸などのアミノ基やカルボキシル基などを有する連鎖移動剤）の共存下で重合することにより、反応性基を凝集性高分子末端に導入し、

これらの反応性基を介してアミド形成反応などにより多糖類の骨格に結合することができる。なお、凝集性高分子の分子量又は長さは、単量体、重合開始剤、連鎖移動剤のモル比などにより制御できる。

【0046】好ましい方法では、高分子の合成と多糖類の骨格への結合とを同時に行うことができる。例えば、多糖類の骨格にCeイオンを作用させて炭素ラジカルを生成させ、ラジカル機構を利用して前記単量体を重合することができる。具体的には、前記単量体と、ラジカルが生成した多糖類とを混合することにより、多糖類のラジカル部位から高分子鎖が成長し、凝集性高分子の側鎖と多糖類との結合を同時に行うことができる。

【0047】他の方法としては、多糖類に重合性基を導入し、前記単量体と重合することにより、凝集性高分子鎖を多糖類に導入する方法が例示できる。例えば、多糖類と、ビニル基や（メタ）アクリロイル基などの重合性基を有する酸無水物（無水（メタ）アクリル酸、無水マレイン酸など）とを反応させて、エステル結合により重合性基を導入し、前記単量体との重合に供することにより、多糖類に凝集性高分子の側鎖を導入できる。この方法においても、凝集性高分子鎖の長さは、多糖類に導入した重合性基と単量体とのモル比などにより制御できる。

【0048】なお、導入された高分子側鎖の分子量又は長さは、多糖類の骨格を酸（例えば、1M硫酸など）で加水分解し、残存する側鎖の分子量をゲルパーミエーションクロマトグラフィなどで測定することにより求めることができる。

【0049】前記凝集性ペプチドは、通常のペプチド合成法、例えば、固相合成法および液相合成法のいずれもの方法でも調製できる。好ましい方法は、操作が簡便な固相合成法である【例えば、日本生化学編「続生化学実験講座2 タンパク質の化学（下）」昭和62年5月20日（株）東京化学同人発行、第641頁～第694頁参照】。

【0050】固相合成法では、反応溶媒に不溶の重合体又は担体（クロロメチル化、オキシメチル化などにより修飾されたスチレン-ジビニルベンゼン共重合体（クロロメチル化樹脂、ヒドロキシメチルフェニルアセトアミドメチル樹脂など）、ベンズヒドリルアミン樹脂（4-メチルベンズヒドリルアミン樹脂など）、マルチデタッチャブル（multi-detachable）樹脂など）が使用される。これらの重合体又は担体を利用したペプチド合成法は慣用の方法、例えば、重合体又は担体に、目的とするペプチドのC末端に対応するアミノ酸のうち α -カルボキシル基を結合させ、目的とするペプチドのN末端の方向に向かって、アミノ酸又はペプチド断片（遊離のカルボキシル基を有し、かつアミノ基などが保護されたアミノ酸やペプチド断片）を順次縮合させる操作と、アミノ基の保護基を脱離する操作とを繰り返してペプチド鎖

を伸長させて、所定のペプチド鎖を形成し、前記重合体からペプチド鎖を脱離させ、保護基を除去することにより目的ペプチドを生成させ、精製することにより、ペプチドを合成できる。

【0051】なお、保護基の種類、縮合反応、保護基の脱離には慣用の方法が利用できる。例えば、アミノ基の保護基としては、ベンジルオキシカルボニル基(Z)、p-ニトロベンジルオキシカルボニル基、p-メトキシベンジルオキシカルボニル基などの置換ベンジルオキシカルボニル基、t-ブトキシカルボニル基(Boc)、フルオレニルメチルオキシカルボニル基(Fmoc)、イソボルニルオキシカルボニル基(Iboc)などが例示でき、カルボキシル基の保護基としては、ベンジルエステル(Obz1)、置換ベンジルエステル、メチルエステル(OMe)、エチルエステル(OEt)、t-ブチルエステル(Obu)、フェナシルエステル(OPac)、シクロヘキシルエステル(Ohex)などが例示できる。また、アミノ酸の側鎖も慣用の保護基で保護できる。

【0052】縮合反応には、種々のカップリング法、例えば、C端活性化法(p-ニトロフェニルエステル(ONp)、N-ヒドロキシスクシンイミドエステル(ONSu)などを利用した活性エステル化法、混合酸無水物、ジフェニルホスホリルアジド(DPPA)などを用いるアジド法、ジシクロヘキシルカルボジイミド(DCC)、ジイソプロピルカルボジイミド(DIPC)、N-エチル-N'-3-ジメチルアミノプロピルカルボジイミド(WSCI)又はその塩酸塩、ベンゾトリアゾール-1-イル-トリス-(ジメチルアミノ)ホスホニウムヘキサフルオロリン化物塩(BOP)などの縮合剤を用いるカップリング試薬法など)などが利用できる。カップリング法においては、縮合剤を単独で用いてもよく、他の成分と組み合わせ使用してもよい。例えば、DCC(又はWSC1)と、N-ヒドロキシスクシンイミド(HONSu)、ヒドロキシベンゾトリアゾール(HOBT)、3-ヒドロキシ-4-オキソ-3,4-ジヒドロ-1,2,3-ベンゾトリアジン(HOObt)などから選択された成分とを組み合わせ用いてもよい。なお、これらの試薬は非水溶性であってもよく、WSC1又はその塩酸塩などのように、水溶性であってもよい。

【0053】保護基の脱離には、慣用の方法、例えば、接触還元、酸(トリフルオロメタンスルホン酸などのスルホン酸類、トリフルオロ酢酸、フッ化水素など)又はアルカリなどが利用できる。ペプチド鎖の重合体からの脱離および保護基の除去は、トリフルオロ酢酸を用いて同時に行うのが副反応を制御する観点から好ましい。また、ペプチドの精製は、慣用の方法、例えば、イオン交換樹脂、各種クロマトグラフィーなどを利用して行うことができ、逆相液体クロマトグラフィーやゲルパーエーションクロマトグラフィーで行うのが効果的である。

【0054】さらに、凝集性ペプチド共重合体も種々の

方法で調製できる。例えば、式 $H-Y-OH$ (Yは前記に同じ)で表されるペプチド又はアミノ酸と、基 R^1 に対応するジカルボン酸又はその酸無水物とを反応させて $HO-CO-R^1-CO-Y-OH$ (Yは前記に同じ)を生成させ、基 R^2 に対応するジアミンと反応させることにより前記共重合体が得られる。

【0055】 R^1 に対応するジカルボン酸としては、例えば、シュウ酸、マロン酸、コハク酸、マレイン酸、グルタル酸、アジピン酸、ピメリン酸、スベリン酸、アゼライン酸、セバシン酸などの C_{2-10} 脂肪族ジカルボン酸又はその酸無水物(無水コハク酸など)、シクロヘキサンジカルボン酸などの C_{4-8} シクロアルカンジカルボン酸、フタル酸、テレフタル酸、イソフタル酸などの芳香族ジカルボン酸又はその酸無水物などが例示できる。

【0056】 R^2 に対応するジアミンとしては、例えば、エチレンジアミン、プロピレンジアミン、テトラメチレンジアミン、ヘキサメチレンジアミンなどの C_{2-6} アルキレンジアミン、ジエチレントリアミンなどのポリアルキレンポリアミン、シクロヘキサレンジアミン、イソホロレンジアミンなどの C_{4-8} 脂環族ジアミン、フェニレンジアミン、キシリレンジアミンなどの芳香族ジアミンなどが例示できる。

【0057】なお、ペプチド又はアミノ酸と、ジカルボン酸又はその酸無水物(無水コハク酸又はコハク酸など)、ジアミン(エチレンジアミンなど)との反応には、前記活性エステル法などの種々のカップリング反応が利用できる。例えば、ペプチド共重合体(1): $-CO-(CH_2)_2-CO-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-NH-(CH_2)_2-NH-$ (X及びnは前記に同じ)、(2): $-CO-(CH_2)_2-CO-Sar-NH-(CH_2)_2-NH-$ 、(3): $-CO-(CH_2)_2-CO-X-NH-(CH_2)_2-NH-$ (Xは前記に同じ)は、(1a) $H-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-OH$ (X及びnは前記に同じ)、(2a) $H-Sar-OH$ 、(3a) $H-Val-OH$ 、 $H-Leu-OH$ 、 $H-Ile-OH$ 、 $H-Nle-OH$ を、それぞれ無水コハク酸と反応させて、(1b) $HO-CO-(CH_2)_2-CO-(Val-Pro-Gly-X-Gly)_n-OH$ (X及びnは前記に同じ)、(2b) $HO-CO-(CH_2)_2-CO-Sar-OH$ 、(3b) $HO-CO-(CH_2)_2-CO-Val-OH$ 、 $HO-CO-(CH_2)_2-CO-Leu-OH$ 、 $HO-CO-(CH_2)_2-CO-Ile-OH$ 、 $HO-CO-(CH_2)_2-CO-Nle-OH$ を生成させる。次いで、各成分(1b)~(3b)とエチレンジアミンとを、それぞれ、適当な範囲、例えば、5~90モル%の範囲で混合した水溶液に、カップリング剤(水溶性カルボジイミド、1-ヒドロキシベンゾトリアゾールなど)を加えて脱重縮合することにより得られる。

【0058】[材料又は生体高分子の製造方法] 非動物

性多糖類の骨格と凝集性セグメント（フラグメント又は側鎖）とを結合する方法は、多糖類の骨格に含まれる官能基の種類と、凝集性セグメントに含まれる官能基の種類との組み合わせによって適宜選択される。例えば、非動物性多糖類がカルボキシル基を有し、凝集性セグメントがアミノ基を有する場合には、通常のアミド基生成反応により多糖類と凝集性セグメントとを結合できる。具体的には、カップリング試薬（カルボジイミド（DCC、DIPIC、WSCIC又はその塩酸塩など）、BOPなどの縮合剤単独、DCC（又はWSCIC）-HONSu、DCC（又はWSCIC）-HOBT、DCC（又はWSCIC）-HOObtなどのカップリング試薬の組合せなど）による脱水縮合反応、活性エステル化法によりカルボキシル基を活性エステルに変換した後、アミノ基とのアミド結合形成反応を行うことなどの方法が挙げられる。

【0059】また、多糖類の官能基がヒドロキシル基である場合には、アルカリ存在下、多糖類とハロカルボン酸（クロロ酢酸など）とを反応させてカルボキシル基を導入し、通常のアミド基生成反応により凝集性セグメントとの結合を行うことができる。さらに、多糖類に含まれるヒドロキシル基を酸化してアルデヒド基を生成させ、凝集性セグメントのアミノ基とシッフ塩基形成反応を経ることにより、凝集性セグメントと結合させることができる。

【0060】本発明の温度応答性材料（温度応答性重合体）は、温度にตอบสนองして溶液状からゲル状に変化する温度応答性を有しており、通常、加熱により溶液からゲルへ変化する。好ましい温度応答性重合体は、温度にตอบสนองして溶液の形態とゲルの形態とに可逆的にあるいは不可逆的に変化する。ゲルは、通常、白濁又は透明である。上記応答温度は、適宜に選択できるが、通常、30℃以上（好ましくは30～50℃、さらに好ましくは33～45℃、特に35～44℃程度）である。

【0061】さらに、温度応答性材料は、非動物性の多糖類骨格を有しているため、生体適合性及び安全性が高く、ウイルスや細菌、プリオンなどの既知又は未知の病原体による感染のおそれが少ない。特に植物由来の多糖類は安全性が高い。さらには、生体内での分解及び／又は吸収・排泄も期待される。なお、高分子量の凝集性高分子は通常、生体内での分解効率が低下するが、重合度が低い場合には排泄が可能である。特に、多糖類骨格と、凝集性ペプチド鎖、および凝集性ペプチド共重合体の鎖は、生体内で分解され、分解生成物の毒性も低く、安全に吸収・排泄される。

【0062】〔温度応答性組成物〕本発明の温度応答性材料は、溶液とゲルとの可逆的な変化を利用して生体に適用する温度応答性組成物の構成成分として有用である。温度応答性組成物は、前記温度応答性材料単独で構成してもよいが、通常、生理学的に許容される担体と組

み合わせて使用される。

【0063】温度応答性組成物の剤形は、特に制限されず、粉体、散剤などの固形剤であってもよいが、温度応答性材料は、通常、液体と組み合わせることにより液剤として利用される。すなわち、液剤の担体としては、水、生理食塩水、緩衝液（リン酸緩衝液など）、アルコール水溶液（エタノール水溶液など）、多価アルコール水溶液（5%グリセリン水溶液、エチレングリコール水溶液、プロピレングリコール水溶液など）、糖水溶液（5%グルコース水溶液、ブドウ糖水溶液など）、アルブミン水溶液（5%アルブミン溶液など）などが例示できる。なお、液剤は、溶液剤、懸濁剤、乳剤、軟膏剤、エアゾール剤、貼付剤（パスタ剤、パップ剤）などであってもよい。液剤中の温度応答性材料（又は温度応答性重合体）の濃度は、重合体の溶液粘度などに応じて、例えば、0.1～90重量%、好ましくは0.5～50重量%、さらに好ましくは1～30重量%（例えば、1～15重量%）、特に1～10重量%程度の範囲から選択できる。

【0064】温度応答性組成物（又は製剤）は、生理的又は薬理的に許容される種々の添加剤、例えば、ポリビニルピロリドン、マクロゴール、ポリビニルアルコール、セルロース誘導体（セルロースエーテル類など）などの高分子、保存剤、安定剤、乳化剤や懸濁化剤、pH調整剤、緩衝剤、薬剤（殺菌剤、消毒剤、抗菌剤、抗ウイルス剤、抗炎症剤、抗アレルギー剤、鎮痛剤、止血剤など）などを含んでいてもよい。

【0065】本発明の温度応答性組成物は、皮膚、筋肉組織や内臓組織などの種々の患部（切開部、切断部、創傷部、剥離部、破砕部など）に適用でき、例えば、患部の組織面の間に介在し、組織の癒着を防止するための癒着防止材、縫合部などの患部に適用し、組織を接着させるための組織接着材、創傷部などの患部を被覆して保護するための（創傷）被覆材、切開部や創傷部などの患部に適用して止血するための止血材や塞栓材などとして利用できる。患部に対する温度応答性組成物の適用量は、患部の部位や面積、ゲル形成が必要とされる時間又は期間などに応じて、患部を被覆可能な範囲から選択できる。

【0066】本発明の材料は、慣用の方法、例えば、前記成分を混合し、必要により滅菌処理し、所定の容器に充填し、滅菌処理することにより調製できる。例えば、患部に容易に適用するため、注出可能な容器（注射器状の容器など）に充填したり、噴射剤と共にスプレーボトルに充填することも可能である。また、貼付剤は、前記組成物を基材に塗布し、塗布層を剥離可能な保護シートで被覆することにより調製できる。

【0067】本発明の材料及び組成物は、患部の温度にตอบสนองして加温され、溶液状からゲル状に変化するため、患部にゲル膜を形成できる。そのため、ヒトの他、種々

の哺乳類（特に、家畜、ペットなどの温血動物）にも適用できる。

【0068】

【発明の効果】本発明の材料（又は重合体）および組成物は、温度に応答して液体からゲルへ変化するとともに、非動物性多糖類を骨格として含むため、安全性が高い。そのため、生体（例えば、患部など）への適用により、塗布部にゲル状の皮膜を形成できる。本発明の組成物は、癒着防止材、組織接着材、創傷被覆材、止血材、塞栓材などの主たる構成成分として有用である。

【0069】

【実施例】以下、実施例により本発明を具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例により限定されるものではない。

【0070】実施例1

【デンプン-PNIPAM共重合体の調製】馬鈴薯澱粉（三和澱粉工業（株））0.1gとN-イソプロピルアクリルアミド（NIPAM）（和光純薬工業（株））0.071gを含む水溶液4mlに、窒素ガスを30分間吹き込むことにより脱気し、硝酸二アンモニウムセリウム（IV）（和光純薬工業（株））3.4mgを1N硝酸水溶液100μlに溶解して加えた。窒素雰囲気下、30℃で一晩重合した。得られた水溶液にアセトンを加えて、馬鈴薯澱粉の骨格にポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PNIPAM）の側鎖が結合した重合体を得た。さらに、重合体を水に溶解してアセトンで沈殿する操作を数回繰り返して精製した（収量：約0.12g、収率：約70%）。

【0071】【評価試験】得られた重合体を、10mMリン酸塩緩衝液（0.15MのNaClを含む。pH7.4）に溶解し、5重量%の溶液を調製した。この溶液は室温（約25℃）では透明な液体であったが、37℃に加温すると白色のゲル状物を形成した。また、このゲル状物を室温まで冷却すると透明な液体となった。

【0072】一方、対照としてのポリ-N-イソプロピルアクリルアミド単独重合体（PNIPAM）の5重量%溶液は、室温では透明な液体であり、37℃で白色の沈殿を生成したが、ゲルを形成しなかった。また、澱粉単独では同濃度で緩衝液に溶解しなかった。

【0073】実施例2

【デキストラン-PNIPAM共重合体の調製】デキストラン（平均分子量約30万、和光純薬工業（株））0.1gをホルムアミド5mlに溶解し、種々の量の無水メタクリル酸（アルドリッチ社）と、トリエチルアミン140μlとを加え、遮光しながら25℃で24時間反応した。得られた反応液を水に対して24時間透析（分子量カット12000）し、メタクリル酸を除去した後、凍結乾燥した。メタクリレート導入率を、NMRにおけるメチルプロトンの面積から求めたところ、糖残基当たり導入率（グルコース単位当たりの平均置換

度）が、（a）0.26のメタクリル酸エステル化物、（b）0.07のメタクリル酸エステル化物、（c）0.01のメタクリル酸エステル化物が得られた。

【0074】メタクリル酸でエステル化された各デキストラン（a）～（c）について、それぞれ3つの1重量%ジメチルスルホキシド（DMS）溶液3mlを調製した。各溶液に、（1）N-イソプロピルアクリルアミド（NIPAM）の10重量%DMS溶液3ml、（2）NIPAMの10重量%DMS溶液1.8ml及びDMS1.2ml、（3）NIPAMの10重量%DMS溶液0.6ml及びDMS2.4mlをそれぞれ加えた。さらに、アゾイソブチロニトリルの5重量%DMS溶液174μlをそれぞれに加え、凍結と融解を交互に3回繰り返して脱気した後、窒素雰囲気下で、70℃に4時間保温した。

【0075】得られた反応生成物を、水に対して24時間透析（分子量カット12000）し、DMSを除去した後、凍結乾燥を行った。さらに、水に対して100時間透析（分子量カット30万）し、デキストランに結合しなかったポリ-N-イソプロピルアクリルアミド（PNIPAM）を除去した後、凍結乾燥を行い、デキストランの骨格にPNIPAMの側鎖が結合した重合体を得た。ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより精製度と分子量を測定した。

【0076】【評価試験】得られた重合体について実施例1と同様の試験を行ったところ、（1）NIPAMの10重量%DMS溶液3ml、（3）NIPAMの10重量%DMS溶液0.6mlを加えて得られた重合体は、37℃で白色のゲル状物を与えた。また、（2）NIPAMの10重量%DMS溶液1.8mlを加えて得られた重合体は、37℃で透明なゲル状物を与えた。これらの重合体の溶液は、すべて、室温に冷却することにより再び透明な液体状となった。さらに、これらの溶液-ゲル挙動は、糖残基あたりのメタクリル酸によるエステルの導入率（a）～（c）に依存しなかった。

【0077】実施例3

【デンプン-ペプチド重合体の調製】式（1）：Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly-NH₂（配列番号：1）で示されるペプチドを、ペプチド自動合成装置を用いて固相合成法により合成した。すなわち、4-（2', 4'-ジメトキシフェニル-フルオレニルメトキシカルボニル）-アミノメチル）-フェノキシアセトアミド-エチル基を0.62ミリモル/g（樹脂）の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体【スチレンとジビニルベンゼンの構成モル比＝99：1】からなる粒状樹脂【米国アプライド・バイオシステムズ社製、Fmocアミドレジン】0.1ミリモルを用い、目的とするペプチドのカルボキシル末端からアミノ末端に向かって順次対応するアミノ酸を結合させた。

【0078】結合反応において、アミノ酸として、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN α -フルオレニルメトキシカルボニル-L-バリン [Fmocバリン]、N α -(フルオレニルメトキシカルボニル)-L-プロリン [Fmocプロリン]、N α -9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシン [Fmocグリシン]を各結合ステップについてそれぞれ1ミリモルずつ用いた。

【0079】得られたペプチド樹脂を5容量%の水を含むトリフルオロ酢酸10mlで2時間脱離処理した。得られた溶液をジエチルエーテルに加え、生成した沈殿物をさらに数回ジエチルエーテルで洗浄して、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。粗生成物をPD10カラム(アマシャムファルマシアジャパン)で精製し、式(1)で示すペプチドを得た。得られた精製ペプチドをHPLC [ファルマシアバイオテク(株)製, AKTA explorer10XT, カラム: ミリポアウオーターズ(株)製, ノバパックC18 3.9mm ϕ ×150mm, 移動相: トリフルオロ酢酸を0.05容量%含有するアセトニトリルと水との混合溶媒(アセトニトリル濃度を30分間で5容量%から50容量%に直線的に変化させた)、流速1.0ml/分]に付したところ、18.5分に単一のピークが示された。FAB法マスマスペクトルにより求めた精製ペプチドの分子量は1655であった(理論値: 1655.0)。

【0080】クロロ酢酸(アルドリッチ社)3gをメタノール40mlに溶解し、この溶液に、3.5gの水酸化ナトリウム(和光純薬工業(株))を溶解した水溶液7mlを加えた。さらに、混合液に、攪拌しながら馬鈴薯澱粉(三和澱粉工業(株))10gを加え、40℃で48時間攪拌を続けた。その後、氷酢酸約2mlで反応液をpH6.5に調整し、メタノールを加えてカルボキシメチル化された澱粉を沈殿物として回収した。回収された沈殿物をメタノールでさらに5回洗浄した後、減圧乾燥し、約10gのカルボキシメチル化澱粉を得た。

【0081】カルボキシメチル化澱粉0.05gを水25mlに溶解し、式(1)で示すペプチド83mg、N-ヒドロキシコハク酸イミド(ペプチド研究所)114mg、水溶性カルボジイミド(1-エチル-3-(3-ジメチルアミノプロピル)-カルボジイミド、ペプチド研究所)198mgを順次加えて溶解し、室温で一晩攪拌した。反応混合液を、水に対して48時間透析(分子量カット3000)して副生成物を除去して、澱粉の骨格に式(1)で示すペプチドの側鎖が結合したデンプン-ペプチド(1)重合体を得た。

【0082】【評価試験】得られたデンプン-ペプチド重合体について、実施例1と同様に試験したところ、37℃で白色のゲル状物を与え、室温に冷却することにより再び透明な液体状となり、溶液-ゲル挙動は37℃で可逆的であった。

【0083】実施例4

[アルギン酸-ペプチド重合体の調製] 式(2):

(N' α , N' ϵ , N'' α , N'' ϵ -テトラ(H-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)₄)-N α , N ϵ -ジリジル)リジル- β -アラニンおよび式(3): (N' α , N' ϵ , N'' α , N'' ϵ -テトラ(H-His-Val-Gln-Val-His-(Val-Pro-Gly-Val-Gly)₂)-N α , N ϵ -ジリジル)リジル- β -アラニンで示されるペプチドを、実施例3と同様の方法で合成した。

【0084】ただし、Fmocアミドレジンの代わりに(N' α , N' ϵ , N'' α , N'' ϵ -テトラフルオレニルメトキシカルボニル-N α , N ϵ -ジリジル)リジル- β -アラニル基を0.14ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体[スチレンとジビニルベンゼンとの構成モル比=99:1]からなる粒状樹脂[米国アプライド・バイオシステムズ社製、FmocMAPレジン4ブランチ]0.025ミリモルを用い、式(3)で示されるペプチドの場合には、結合反応において、実施例3に示したアミノ酸以外に、米国アプライド・バイオシステムズ社製のN α -9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N γ -トリチル-L-グルタミン[Fmocグルタミン]、N α -9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-N ϵ -トリチル-L-ヒスチジン[Fmocヒスチジン]を、各結合ステップについてそれぞれ1ミリモルずつ用いた。

【0085】さらに式(3)で示されるアミノ酸配列を含むペプチドの場合には、5容量%の水を含むトリフルオロ酢酸10mlの代りに、2.5容量%エタンジチオール(東京化成(株))と2.5容量%の水を含むトリフルオロ酢酸10mlを用いて、ペプチドの脱保護と樹脂からの脱離を行った。

【0086】実施例3と同様のHPLCに付したところ、式(2)で示される精製ペプチドでは22.6分に、式(3)で示される精製ペプチドでは17.8分にそれぞれ単一のピークが示された。

【0087】アルギン酸ナトリウム(和光純薬工業(株)): 1級、1重量%水溶液の粘度(温度20℃)500~600cp)20mgを10mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)10mlに溶解し、式(2)で示すペプチド35mg、あるいは式(3)で示すペプチド31mgをそれぞれ加えて溶解した。さらにN-ヒドロキシコハク酸イミド12mgと前記水溶性カルボジイミド10mgとを順次加えて溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液を水に対して48時間透析(分子量カット3000)して副生成物を除去し、アルギン酸の骨格に式(2)で示すペプチドの側鎖が結合したアルギン酸-ペプチド(2)重合体と、アルギン酸の骨格に式(3)で示すペプチドの側鎖が結合したアルギン酸-ペプチド(3)重合体を得た。

【0088】【評価試験】得られたアルギン酸-ペプチド重合体について、実施例1と同様に試験したところ、いずれも37℃で白色のゲル状物を与えた。また、アルギン酸-ペプチド(2)重合体は室温に冷却することにより再び透明な液体状となり、溶液-ゲル挙動は37℃で可逆的であった。一方、アルギン酸-ペプチド(3)重合体は室温に冷却しても液体とならず、不可逆的なゲル化を示した。

【0089】実施例5

【アルギン酸-ペプチド重合体の調製】式(4): Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val ProGly Val Gly Val Pro Gly Val Gly (配列番号: 2) で示されるペプチドを実施例3と同様の方法で合成した。ただし、Fmocアミドレジンの代わりに4-(N α -9-(フルオレニルメトキシカルボニル)-グリシル)-オキシメチル-フェノキシメチル基を0.80ミリモル/g(樹脂)の割合で有するスチレン-ジビニルベンゼン共重合体[スチレンとジビニルベンゼンとの構成モル比=99:1]からなる粒状樹脂[米国アプライド・バイオシステムズ社製、HMPグリシン] 0.1ミリモルを用いた。

【0090】実施例3と同様のHPLCに付したところ、式(4)で示される精製ペプチドでは18.6分に単一のピークが示された。

【0091】式(4)で示されるペプチド、またはサルコシン(和光純薬工業(株))、イソロイシン(和光純薬工業(株))を水に溶解し、それぞれ等モルの無水コハク酸を加え、攪拌しながら1N水酸化ナトリウム水溶液を滴下することにより、反応系のpHを略7.0に保った。反応により、略100%の収率でコハク酸化ペプチド又はコハク酸化アミノ酸が得られた。

【0092】コハク酸化された式(4)で示すペプチドと、コハク酸化サルコシンと、コハク酸化イソロイシンと、エチレンジアミン(和光純薬工業)とを、1:1.5:4.5:7のモル比で水に溶解した後、前記水溶性カルボジイミドをモル比で35、1-ヒドロキシベンゾトリアゾール(ペプチド研究所)をモル比16の割合で加えて溶解し、室温で24時間攪拌した。反応生成物をPD10カラムで精製した。ゲルパーミエーションクロマトグラフィーにより測定した平均分子量は約5500であった。

【0093】アルギン酸ナトリウム(和光純薬工業(株))、1級、1重量%水溶液の粘度(温度20℃)500~600cp)20mgを10mMリン酸塩緩衝液(pH7.4)10mlに溶解し、上記得られた式(4)で示すペプチドを含む共重合体20mgを加えて溶解した。さらにN-ヒドロキシコハク酸イミド12mgと前記水溶性カルボジイミド19mgとを順次加えて溶解し、室温で一晩攪拌した。反応液を水に対して48時間透析(分子量カット3000)して副生成物を除去し、アルギン酸の骨格に式(4)で示すペプチドを含む共重合体の側鎖が結合したアルギン酸-ペプチド(4)重合体を得た。

【0094】【評価試験】得られたアルギン酸-ペプチド(4)重合体について、実施例1と同様に試験したところ、37℃で透明のゲル状物を与え、室温に冷却することにより再び透明な液体となった。

【0095】

【配列表】

【0096】

【配列表フリーテキスト】

SEQUENCE LISTING

<110> Japan Medico Co., Ltd.
Japan Science and Technology Corporation
<120> A thermoresponsive material and a composition comprising the same
<130> P010024
<140>
<141>
<160> 2
<170> PatentIn Ver. 2.1
<210> 1
<211> 20
<212> PRT
<213> Artificial Sequence
<220>
<223> Description of Artificial Sequence: agglomerative peptide
<300>
<303> Prog. Biophys. molec. Biol.

23

24

<304> 57

<306> 23-57

<307> 1992

<400> 1

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

1

5

10

15

Pro Gly Val Gly

20

<210> 2

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Description of Artificial Sequence:agglomerative
peptide

<300>

<303> Prog. Biophys. molec. Biol.

<304> 57

<306> 23-57

<307> 1992

<400> 2

Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val Pro Gly Val Gly Val

1

5

10

15

Pro Gly Val Gly

20

フロントページの続き

(51)Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テーマコード(参考)

C O 9 K 3/00

A 6 1 L 15/01

// C O 7 K 7/08

Z N A

25/00

A

(72)発明者 山岡 哲二

大阪府茨木市紫明園10-74 イトーピア紫
明園202号

Fターム(参考) 4C081 AA02 AA12 AA14 AC04 BA11

BB03 CA102 CD031 CD041

CD112 DA12 DA15

(72)発明者 三上 博

愛知県春日井市藤山台9-9-11

4C090 AA02 AA09 BA15 BA72 BD09

BD17 DA22

(72)発明者 木下 久雄

奈良県生駒市小平尾町42-10

4H045 AA10 AA30 BA53 BA56 EA34

FA34 FA61 GA22 HA03 HA06

4J031 AA02 AA04 AA22 AB01 AB06

AC07 AD01 AF03 AF09

THIS PAGE BLANK (USPTO)